昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, March 2012, 55(3): 357 – 360 ISSN 0454-6296

大麦虫不同虫态甲醇粗提物化学成分的分析和比较

陈雯婷[1]，刘海利[1]，姚励功[1]，叶柱良[2]，郭跃伟[1,*]
(1. 中国科学院上海药物研究所国家新药研究重点实验室，上海 201203；
2. 广东南方珍稀昆虫繁育研究中心，广东东莞 523800)

摘要：为了探寻大麦虫 *Zophobas morio* 变态发育过程中化学成分的变化，本研究利用薄层色谱技术对大麦虫的3个虫态(幼虫、蛹和成虫)甲醇粗提物中的化学成分进行分析和比较，利用柱色谱技术、核磁共振氢谱技术(^{1}H NMR)和气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)对蛹甲醇粗提物进行重点分析。结果表明：虫蛹甲醇粗提物中含有幼虫和成虫甲醇粗提物中不存在的化学成分。对虫蛹甲醇粗提物进行针对性的结构研究，共鉴定出10个脂肪酸。其中，存在于大麦虫虫蛹中的10-十六碳酮酸、10-十八碳酮酸为首次从自然界昆虫中获得；(8*E*, 11*E*)-8, 11-十八碳烯酸、(9*Z*, 12*Z*)-9, 12-十八碳烯酸、(9*Z*, 12*Z*, 15*Z*)-9, 12, 15-十八碳烯酸、8-(3-辛基-2-环氧乙烷基)辛酸和8-(2-辛基环丙烷基)辛酸为首次从大麦虫中发现。以上研究结果为针对大麦虫不同生物阶段的开发利用提供新的理论依据。

关键词：大麦虫；蛹；甲醇粗提物；化学成分；10-十六碳酮酸；10-十八碳酮酸
中图分类号：Q968 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2012)03-0357-04

Assay and comparison of chemical constituents of crude methanol extracts from different developmental stages of darkling beetle *Zophpbas morio* (Coleoptera: Tenebrionidae)

CHEN Wen-Ting[1], LIU Hai-Li[1], YAO Li-Gong[1], YE Zhu-Liang[2], GUO Yue-Wei[1,*] (1. State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; 2. Southern China Guangdong Rare Insect Breeding Research Center, Dongguan, Guangdong 523800, China)

Abstract: To study the chemical changes of darkling beetle *Zophobas morio* during metamorphosis, the crude methanol extracts of *Z. morio* in three developmental stages (larva, pupa and adult) were assayed by modern chromatographic techniques, ^{1}H NMR and GC-MS and compared. The results showed that pupae contained characteristic chemical constituents. The methanol extract of the pupae was systematically studied and ten fatty acids were identified. 10-oxohexadecanoic acid and 10-oxooctadecanoic acid were found from pupae of *Z. morio*, which were separated from insects for the first time. (8*E*, 11*E*)-8, 11-octadecenoic acid, (9*Z*, 12*Z*)-9, 12-octadecenoic acid, (9*Z*, 12*Z*, 15*Z*)-9, 12, 15-octadecenoic acid, 8-(3-octyl-2-oxiranyl) octanoic acid, and 8-(2-octylcyclopropyl) octanoic acid were also found from *Z. morio* for the first time. These results offer the new theoretical basis for the utilization of darkling beetle at different developmental stages.

Key words: *Zophobas morio*; pupa; crude methanol extract; chemical constituent; 10-oxohexadecanoic acid; 10-oxooctadecanoic acid

大麦虫 *Zophobas morio* 俗称麦片虫、麦谷虫或超级面包虫，隶属于昆虫纲(Insecta)鞘翅目(Coleoptera)拟步行甲科(Tenebrionidae)粉甲属 *Tenebrio*，是我国从东南亚国家引进的新型蛋白源昆虫。大麦虫的幼虫含丰富的不饱和脂肪酸、人体必需蛋白，同时含有各种糖类，氨基酸，维生素，激素，酶及矿物质磷、铁、钾、钠、锌等。其生长周期及速度与黄粉虫相同，从卵孵化到成虫羽化约需

基金项目：国家自然科学基金项目(21021063)；国家海洋"863"计划项目(2011AA09070102)；欧盟第七框架计划 IRSES 项目(2010-2014)；新药研究国家重点实验室基金(SIMM1105KF-04, SIMM1106KF-11)
作者简介：陈雯婷，女，1988年生，湖北宜昌人，硕士研究生，研究方向为天然产物化学，E-mail: windychen1110@gmail.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: ywguo@mail.shcnc.ac.cn
收稿日期 Received: 2011-08-18；接受日期 Accepted: 2012-02-28

3 个多月的时间，而其产量是黄粉虫的 5 倍，体长、体重、体宽是黄粉虫或黑粉虫的 3～4 倍，营养价值更是远远超过幼体蟋蟀和黄粉虫，是人工养殖最理想的饲料昆虫(许齐爱等，2008)。大麦虫适合大规模养殖，易产业化，开发潜力极大，被称为将成为继蚕和蜜蜂之后的第三大昆虫产业。

目前国内外对大麦虫的研究报道仅局限于常规营养成分种类和含量的测定(Barker *et al*., 1998; Finke, 2002)及大麦虫蛋白质的提取分离(郭倩等，2011)，其他相关报道均为将其作为昆虫实验材料进行的生物学(Fleissner *et al*., 1993)、形态学(Kutsch *et al*., 1994)、分类学(Scofield *et al*., 1995)、酶学(Viviani and Prado, 2009)与环境学(苗少娟和张雅林，2010)等方面的研究。迄今未见对大麦虫 3 个不同虫态(幼虫、蛹和成虫)开展系统的化学成分研究。本研究利用现代色谱技术及 ^{1}H NMR 和 GC-MS 等波谱学鉴定方法，对大麦虫幼虫、蛹和成虫甲醇粗提物中的化学成分进行分析比较，发现蛹中含有独特的化学成分。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫：大麦虫幼虫、蛹和成虫于 2009 年 10 月购买自广东南方珍稀昆虫繁育研究中心，由南方珍稀昆虫繁育研究中心叶柱良鉴定为大麦虫。

1.1.2 仪器与试剂：Varian Mercury 300 型核磁共振仪，^{1}H NMR 位移值以氘代溶剂中残存的 $CHCl_3$ (δ 7.26 ppm)为内标，化学位移 δ 为 ppm，偶合常数为赫兹(Hz)；Autospec Premier 高分辨气质联用色谱仪(DB-5 弹性石英毛细管柱，30 m×0.25 mm×0.25 μm)；Sephadex LH-20(Pharmacia)；柱层析硅胶(SiO_2，200～300 目，青岛海洋化工厂)；薄层层析硅胶(G60，F-254，烟台芝罘黄务硅胶开发试验厂)；薄层显色剂硫酸-香兰素(实验室配制)；所用试剂均为分析纯；$CH_3N(NO)CONH_2$(实验室合成)。

1.2 大麦虫化学成分的提取和 TLC 分析

1.2.1 提取：大麦虫虫蛹、幼虫、成虫 3 个虫态的虫体各 300 g 分别经冷冻、干燥、粉碎，用 MeOH 超声提取 3 次(15 min/次)，合并后减压浓缩，得虫蛹、幼虫和成虫甲醇粗提物。虫蛹、幼虫和成虫甲醇粗提物分别用乙醚萃取 3 次，得到虫蛹、幼虫和成虫乙醚浸膏。

1.2.2 TLC 分析：将大麦虫虫蛹、幼虫和成虫乙醚浸膏溶解于氯仿，配置成供试品溶液，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，分别以石油醚-乙醚(7∶3, v/v)、石油醚-乙酸乙酯(5∶5, v/v)、氯仿-甲醇(9∶1, v/v)为展开剂上行展开，取出，晾干，涂以硫酸-香兰素，于 105℃加热至斑点显色清晰。

1.3 大麦虫虫蛹化学成分的分离和结构鉴定

1.3.1 分离：虫蛹乙醚浸膏(15 g)经 200～300 目硅胶柱层析，以石油醚-乙酸乙酯(90∶10→70∶30→50∶50, v/v)、氯仿-甲醇(90∶10→50∶50→0∶100, v/v)梯度洗脱。其中，氯仿-甲醇(90∶10, v/v)洗脱部分经 Sephadex LH-20 凝胶柱层析，以氯仿-甲醇(1∶1, v/v)洗脱，得到组分 CM-9-32(140.5 mg)，硫酸-香兰素显色为橙黄色斑点；氯仿-甲醇(70∶30, v/v)洗脱部分经 200～300 目硅胶柱层析进一步纯化，得到组分 CM-12-4(72.4 mg)，硫酸-香兰素显色为紫色斑点。

1.3.2 GC-MS 分析：对 CM-9-32 和 CM-12-4 进行甲酯化处理。将上述两组份分别溶解于少量无水乙醚中，加入适量的重氮甲烷，室温下搅拌 10 min，用硅胶柱纯化后减压去除溶剂；甲基化产物作 GC-MS 分析。气相色谱条件：AutospecPremier 色谱柱 DB-5 弹性石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm)，每次进样量 0.2 μL。升温程序：初始温度 100℃，以 10℃/min 升至 230℃。汽化温度 260℃；载气：高纯氦；流量 1 mL/min。质谱条件：电子轰击 EI 离子源(70 eV)；离子源温度 230℃；分辨率 1 000；质量扫描范围 *m/z*：50～500 amu。

2 结果和分析

2.1 不同虫态甲醇粗提物的共薄层层析结果

在石油醚-乙醚和石油醚-乙酸乙酯展开系统中，薄层层析分析(图 1)结果显示，在中低极性部位，3 种样品无明显差别，均为一系列拖尾的紫色斑点。而在氯仿-甲醇展开系统中，薄层色谱图见图 1，薄层层析分析结果显示，在较大极性部位，虫蛹甲醇粗提物的乙醚浸膏中除了含有幼虫、成虫乙醚浸膏中系列不饱和脂肪酸外，还有自身独特化学成分，即在 R_f = 0.75 处有明显橙黄色斑点($CHCl_3$∶MeOH = 9∶1)，因此，我们针对虫蛹浸膏中的特征性化学成分进行了深入的研究。

2.2 虫蛹部分的 TLC 和 ^{1}H NMR 结果分析

虫蛹 CM-9-32 组分，在 TLC 分析中用硫酸-香兰素显色后呈现单一橙黄色斑点(R_f = 0.75; $CHCl_3$∶MeOH = 9∶1)，进一步与成虫、幼虫乙醚浸膏

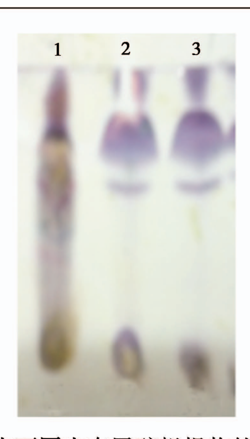


图 1　大麦虫不同虫态甲醇粗提物的薄层色谱图

Fig. 1　The thin-layer chromatogram of crude methanol extracts from different developmental stages of *Zophpbas morio*

1：虫蛹 Pupa；2：幼虫 Larva；3：成虫 Adult.

薄层层析分析比较，发现组分 CM-9-32 中含有虫蛹所特有的化学成分；而组分 CM-12-4 中含有与成虫、幼虫相类似化学成分。此点未在成虫和幼虫乙醚浸膏中出现。甲基化后进一步纯化得甲酯化的 CM-9-32。^{1}H NMR（300 MHz，$CDCl_3$）δ：3.67（s，3H，OCH_3），2.39（t，4H，J=9 Hz），2.30（t，2H，J=9 Hz），1.53～1.61（m），1.26～1.30（m），0.88（t，3H，J=6 Hz，CH_3）。其中，δ 3.67 为甲氧基氢信号峰，δ 2.39，2.30 为酮/酯羰基 α 位碳上的氢信号峰，0.88 为链端甲基氢信号峰。以上提示 CM-9-32 组分主要含有长链酮酸。

虫蛹 CM-12-4 组分，在 TLC 分析中用硫酸-香兰素显色后呈现单一紫色斑点（R_f=0.62；$CHCl_3$：MeOH=7∶3），进一步与成虫、幼虫乙醚浸膏薄层层析分析比较，发现此点在成虫和幼虫乙醚浸膏中出现。甲基化后进一步纯化得甲酯化的 CM-12-4。^{1}H NMR（300 MHz，$CDCl_3$）δ：5.38（m，2H），3.67（s，3H，OCH_3），2.30（t，2H，J=9 Hz），1.62（m），1.43（m），1.26～1.31（m），0.88（t，J=6 Hz，3H，CH_3）。其中，δ 5.38 为双键氢信号峰，δ 3.67 为甲氧基氢信号峰，δ 2.30 为酯羰基 α 位碳氢信号峰，0.88 为链端甲基氢信号峰。以上提示 CM-12-4 组分主要含有长链不饱和脂肪酸。

2.3　虫蛹 CM-9-32 组份和 CM-12-4 组分甲酯化后的 GC-MS 结果分析

将甲酯化后的 CM-9-32 组份和 CM-12-4 组份，用 GC-MS 分析，得总离子流图。利用 CAS 质谱数据库对谱图进行计算机检索、人工谱图解析，鉴定了其中 10 种化学成分，结果见表 1。

根据上述 GC-MS 检测结果，我们发现 CM-9-32 部分含有以 10-十八碳酮酸（64.30%）为主要代谢产物的长链酮酸。CM-12-4 部分含有以 9-十八碳烯酸（72.74%）为主要代谢产物的长链不饱和脂肪酸。以上说明，长链酮酸仅存在于大麦虫 3 个虫态中的蛹期，而长链不饱和脂肪酸普遍存在于大麦虫的 3 个虫态。

进一步经文献检索，10-十八碳酮酸和 10-十六碳酮酸为自然界昆虫中首次发现；（8*E*，11*E*）-8，11-十八碳烯酸、（9*Z*，12*Z*）-9，12-十八碳烯酸、（9*Z*，12*Z*，15*Z*）-9，12，15-十八碳烯酸、8-（3-辛基-2-环氧乙烷基）辛酸、8-（2-辛基环丙烷基）辛酸均为首次从大麦虫中发现。

表 1　大麦虫蛹 CM-9-32 组份和 CM-12-4 组分甲酯化的 GC/MS 鉴定结果

Table 1　Compounds of the esterified CM-9-32 and CM-12-4 from *Zophpbas morio* pupae determined by GC-MS

组分 Section	保留时间（min） Retention time	分子量 Molecular weight	化合物 Compounds	相对含量（%） Relative content
CM-9-32	13.33	284	10-十六碳酮酸甲酯 Methyl 10-oxohexadecanoate	4.71
CM-9-32	15.46	310	8-（2-辛基环丙烷基）辛酸甲酯 Methyl 8-（2-octylcyclopropyl） octanoate	12.18
CM-9-32	16.04	312	10-十八碳酮酸甲酯 Methyl 10-oxooctadecanoate	64.30
CM-12-4	12.02	256	正十六酸 Palmitate	3.01
CM-12-4	13.50	268	（*Z*）-9-十六烯酸甲酯 Methyl （*Z*）-hexadec-9-enoate	1.20
CM-12-4	15.34	294	8*E*，11*E*-8，11-十八碳二烯酸甲酯 Methyl （8*E*，11*E*）-8，11-octadecadienoate	0.97
CM-12-4	15.56	294	（9*Z*，12*Z*）-9，12-十八碳二烯酸甲酯 Methyl （9*Z*，12*Z*）-9，12-octadecadienoate	1.88
CM-12-4	15.94	312	8-（3-辛基-2-环氧乙烷基）辛酸甲酯 Methyl 8-（3-octyl-2-oxiranyl） octanoate	13.11
CM-12-4	16.77	282	（*Z*）-11-十八烯酸甲酯 Methyl （*Z*）-octadec-11-enoate	72.74
CM-12-4	17.45	292	（9*Z*，12*Z*，15*Z*）-9，12，15-十八碳烯酸甲酯 Methyl （9*Z*，12*Z*，15*Z*）-9，12，15-octadecatrienoate	1.72

3 讨论

大麦虫含有丰富的不饱和脂肪酸，以 $C_{16} \sim C_{18}$ 的不饱和脂肪酸为主，大大优于动物性脂肪，是油脂供应的一个很好来源。Takatori 和 Yamaoka (1977)在尸蜡中发现了少量的10-十八碳酮酸和10-十六碳酮酸，其含量分别为1.3%和1.6%；Barakat 等(1994)等猜想这两个化合物是由常见Δ9脂肪酸(Δ9棕榈油酸或油酸)在微生物的硫酸盐还原作用后发生氧化而形成的。而这一反应是成岩初期的一个基本过程；Barakat 和 Rullkiitter(1998)在从170.5 m 处的含硫丰富的黑色页岩 Nördlinger Ries (德国南部)湖泊沉积物样品里抽滤的沥青中发现大量的10-十八碳酮酸和10-十六碳酮酸，其中的主要成分也是10-十八碳酮酸。

在本实验中，我们首次从自然界昆虫中发现了10-十八碳酮酸和10-十六碳酮酸。相对于油酸来说，10-十八碳酮酸含量更多。在平行分析中，我们并没有在同样含有大量油酸和棕榈油酸的成虫和幼虫中发现这两个酮酸成分，所以很大程度上可以判定这两个化合物不是因为动物体死亡后由微生物分解成尸蜡而形成的。

10-十八碳酮酸和10-十六碳酮酸与自然界中的成岩反应有着密切的联系，而在大麦虫这一昆虫体内发现该物质将大麦虫置于生物进化学上的一个关键的角色。迄今为止，还未有人对10-十八碳酮酸和10-十六碳酮酸的生物活性进行过研究，大麦虫虫蛹如此大量的生成这两种酮酸，对其自身生物学具有显著的意义，值得进一步探讨，这两个化合物的生物学活性也值得研究。通常，羟基和环氧基脂肪酸被认为具有较好的抗菌活性(Kato, 1988)，据此推测10位酮酸也很可能是大麦虫自身防御性化学分泌物的前体，与其化学性分泌物有关，进而与昆虫的化学性防御机制相关。

同时，本研究中发现的8-(2-辛基环丙烷基)辛酸也是大麦虫的报道中未提及的成分。Knothe (2006)指出环丙烷脂肪酸在自然界中是细菌细胞膜卵磷脂的基本组成成分。这一发现为大麦虫虫蛹共生菌一说提供了线索。

综上所述，大麦虫不仅在动物饲养和人体营养保健方面具有巨大的开发潜力，而且很可能在生物生态学或化学性防御中具有重大意义。同时，本研究可为针对大麦虫不同生物阶段的开发利用提供新的依据。

参考文献(References)

Barakat AO, Peakman TM, Rullkötter J, 1994. Isolation and structural characterization of 10-oxo-octadecanoic acid in some lacustrine sediments from the Nördlinger Ries (southern Germany). *Organic Geochemistry*, 21(8-9): 841-847.

Barakat AO, Rullkiitter J, 1998. Product distribution from oxidative degradation of sulphur-rich kerogens from the Nördlinger Ries (southern Germany). *Fuel*, 77(1-2): 85-94.

Barker D, Fitzpatrick MP, Dierenfeld ES, 1998. Nutrient composition of selected whole invertebrates. *Zoo Biology*, 17: 123-134.

Finke MD, 2002. Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biology*, 21: 269-285.

Fleissner G, Fleissner G, Frisch B, 1993. A new type of putative non-visual photoreceptors in the optic lobe of beetles. *Cell and Tissue Research*, 273(3): 435-445.

Guo Q, Zhang JX, He GM, Liu N, 2011. Study on extraction and antioxidant activity analysis of barley pest protein. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 20(2): 188-192. [郭倩，张建新，何桂梅，刘娜，2011. 大麦虫蛋白质的提取分离及抗氧化性研究. 西北农业学报，20(2): 188-192]

Kato T, 1988. The physiological role of oxygenated unsaturated fatty acids. *Yukagaku*, 37(10): 898-905.

Knothe G, 2006. NMR characterization of dihydrosterculic acid and its methyl ester. *Lipids*, 41(4): 393-396.

Kutsch W, Urbach R, Breidbach O, 1994. Comparison of motor patterns in larval and adult stage of a beetle, *Zophobas morio*. *Journal of Experimental Zoology*, 267(4): 389-403.

Miao SJ, Zhang YL, 2010. Feeding and degradation effect on the plastic of *Zophobas morio*. *Journal of Environmental Entomology*, 32(4): 435-444. [苗少娟，张雅林，2010. 大麦虫 *Zophobas morio* 对塑料的取食和降解作用研究. 环境昆虫学报，32(4): 435-444]

Scofield AM, Witham P, Nash RJ, Kite GC, Fellows LE, 1995. Castanospermine and other polyhydroxy alkaloids as inhibitors of insect glycosidases. *Comparative Biochemistry and Physiology A - Molecular & Integrative*, 112(1): 187-196.

Takatori T, Yamaoka A, 1977. The mechanism of adipocere formation II. Separation and identification of oxo fatty acids in adipocere. *Forensic Science*, 10(2): 117-125.

Viviani VR, Prado RA, Arnoldi FCG, Abdalla FC, 2009. An ancestral luciferase in the Malpighi tubules of a non-bioluminescent beetle. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8(1): 57-61.

Xu QA, Peng WL, Li XX, Ren SX, Qiu BL, 2008. Research advances on the economic insect of mealworm and superworm. *Anhui Agric. Sci. Bull.*, 14(21): 158-160. [许齐爱，彭伟录，李小玺，任顺祥，邱宝利，2008. 经济昆虫黄粉虫与大麦虫研究进展. 安徽农学通报，14(21): 158-160]

(责任编辑：武晓颖)